

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **09-113512**

(43)Date of publication of application : **02.05.1997**

(51)Int.CI. **G01N 33/543**
G01N 33/543

(21)Application number : **08-131602** (71)Applicant : **OLYMPUS
OPTICAL CO
LTD**

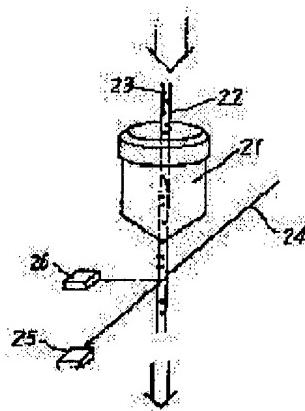
(22)Date of filing : **27.05.1996** (72)Inventor : **KARAKI
SACHIKO**

(54) IMMUNOLOGIC ANALYTICAL METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an immunologic analytical method capable of analyzing a large number of items in a short time and with one device with high accuracy.

SOLUTION: A sample of $10\ \mu$ is reacted with the reactive solution 23 containing a large number of carriers in which antigen and antibody corresponding to the analytical items are solidified and the buffer solution for the prescribed period of time. Then, the reactive solution 23 is introduced in a needle 22 of a flow cell 21 without removing the non-reacted components, and flowed, and at the same time, the reactive solution 23 in the flow cell 21 is irradiated with the laser beam 24, and every irradiation data are obtained for each immune complex, the irradiation data are sorted into individual data to be expressed by the grain size, and indicated as the total amount so as to enable comparison of the quantity of the individual data by the grain size.



[Date of request for examination] 27.05.1996

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the
examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for
application]

[Patent number] 2709296

[Date of registration] 17.10.1997

[Number of appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-113512

(43)公開日 平成9年(1997)5月2日

(51)Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/543

識別記号
5 0 1
5 2 5

府内整理番号
F I
G 0 1 N 33/543

技術表示箇所
5 0 1 D
5 2 5 C

審査請求 有 発明の数1 OL (全4頁)

(21)出願番号 特願平8-131602
(62)分割の表示 特願昭59-255208の分割
(22)出願日 昭和59年(1984)12月3日

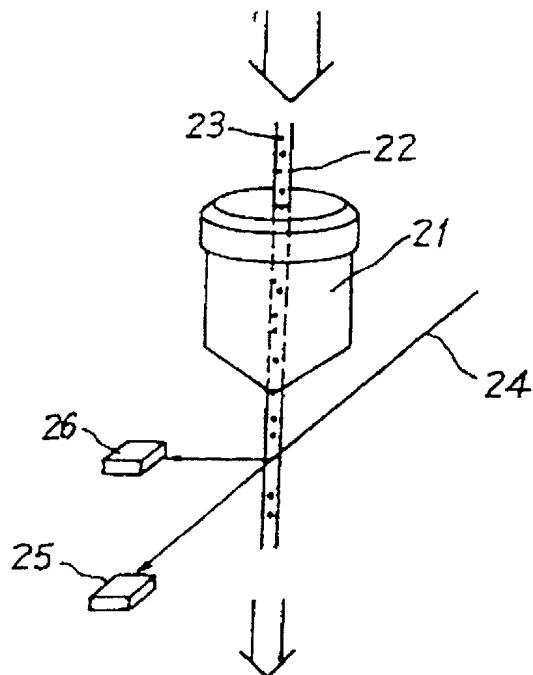
(71)出願人 000000376
オリンパス光学工業株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(72)発明者 唐木 幸子
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

(54)【発明の名称】 免疫学的分析方法

(57)【要約】

【課題】 この発明の課題は、多項目の分析を短時間でかつ1台の装置で、しかも高精度にできる免疫学的分析方法を提供しようとするものである。

【解決手段】 $10\mu l$ のサンプルと、分析項目に対応する抗原または抗体を固相化した多数の担体と緩衝液とを含む反応液23を所定温度で所要時間反応させた後に、前記反応液23を、未反応成分を除去することなく、フローセル21のニードル22に導入して流すと共に、フローセル21内の反応液23に対してレーザ光24を照射してその受光データを免疫複合体毎にもれなく得て、受光データを粒子径で表現される個別データに分別すると共に、粒子径毎に個別データの数量を比較し得るよう総量として表示する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】少量のサンプルと複数の分析項目に対応する抗原または抗体を固相化した多数の担体とを含む反応液を同時または逐次に得る工程と、前記反応液を共通のフローセル中に流す工程と、フローセル内の反応液に対してレーザ光を照射してその受光データを得る工程と、受光データを粒子径で表現される個別データに分別し、粒子径毎のデータ総量を表示する工程とを有することを特徴とする免疫学的分析方法。

【請求項2】流し工程が、 $10 \mu l$ 程度のサンプルを充分数量の担体および緩衝液と混合した反応液を、未反応成分を除去することなく、フローセルのニードルに導入する工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の免疫学的分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、サンプル中の抗原または抗体と反応する抗体または抗原を固相化した担体を用いた免疫学的分析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血液、体液等に含まれるグロブリン、酵素等の蛋白質、ホルモン、細菌、ウイルス等はその分子構造が類似していたり、ごく微量であるために、通常の分析方法では同定、定量が困難である。そこで、これらの物質の分析には、抗原または抗体を粒子状の担体に固相化して抗原抗体反応を起こすようにした免疫学的な分析方法が一般に用いられている。

【0003】このような免疫学的分析方法には、例えば、標識物質を用いるものとして、RIA（ラジオイムノアッセイ）、EIA（エンザイムイムノアッセイ）、FIA（フルオロイムノアッセイ）等がある。また、これらの標識物質を用いる分析方法は、測定系において、例えば標識物質で標識した抗体（抗原）とサンプル中の抗原（抗体）とが抗原抗体反応を起こした免疫複合体（Bound）と、抗原抗体反応に関与せず、自由（Free）な状態で残余する未反応成分としての標識抗体（抗原）とを分離する操作、いわゆるB-F分離を必要とするヘテロジニアス法と、必要としないホモジニアス法とに分類される。

【0004】上記のヘテロジニアス法による分析方法としては、特開昭53-10495号公報において、カラムクロマトグラフィーを利用してB-F分離を行うようにしたものが提案されている。これは、例えば溶液中の遊離物質（Free）を選択的に吸着し、免疫複合体（Bound）を吸着しないイオン交換樹脂や、分子ふるい効果を有するゲルクロマトグラフィー用の充填剤を吸着剤として用いて、所要の反応時間後にサンプルを含む遊離成分を未反応成分として、B-F分離するというものである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、このようにB

10

20

30

40

50

-F分離をカラムクロマトグラフィーを用いて行うものにおいて、多項目の分析を行うとすると、項目毎にカラムを作成しなければならないと共に、反応液を項目毎に異なるカラムに吸着させる操作が必要となる。したがって、反応液の所要量が増すと共に、分析操作が煩雑になってしまう。また、各カラムにおいて免疫複合体の大きさや形状にばらつきがあったり、免疫複合体と遊離物質との大きさが近接していると、B-F分離自体が困難となつて精度が悪くなるとともに、B-F分離によってそれ以降の反応が起こらなくなるので、サンプルを効率良く利用できない。しかも、例えば免疫グロブリン等の試薬として用いる抗体と同じ分子や、化学的、物理的に類似した分子の測定には使用できず、分析項目が極めて制限される。

【0006】本発明の目的は、上述した不具合を解決し、免疫複合体の大きさや形状にばらつきがあつても高精度に測定できるとともに、多項目の分析を短時間で且つ1つの装置で実施できる免疫学的分析方法を提供しようとするものである。さらに、本発明の目的は、少量のサンプルから充分量の測定結果を正確に且つ効率良く得ることのできる免疫学的分析方法を提供しようとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、少量のサンプルと複数の分析項目に対応する抗原または抗体を固相化した多数の担体とを含む反応液を同時または逐次に得る工程と、前記反応液を共通のフローセル中に流す工程と、フローセル内の反応液に対してレーザ光を照射してその受光データを得る工程と、受光データを粒子径で表現される個別データに分別し、粒子径毎のデータ総量を表示する工程とを有することを特徴とする。ここで、流し工程は、 $10 \mu l$ 程度のサンプルを充分数量の担体および緩衝液と混合した反応液を、未反応成分を除去することなく、フローセルのニードルに導入する工程を含むのが好ましい。

【0008】

【発明の実施の形態】図1は本発明の分析方法における反応模式図の一実施形態を示すものである。本形態において、符号1、2および3はそれぞれ担体に用いるポリスチレン製のラテックスで粒径は例えばラテックス1が $0.5 \mu m$ 、ラテックス2が $1.0 \mu m$ 、ラテックス3が $1.5 \mu m$ というように、各径で均一なものを用いる。符号4、5および6は各径のラテックス1、2および3にそれぞれ物理的吸着により固相化した固相抗体である。また、符号7、8および9はサンプルである血清等に含まれている抗原で、符号10、11および12はそれぞれの抗原7、8および9に特異的に結合する抗体をFITC等の蛍光物質で標識した標識抗体である。

【0009】以下、ヒト免疫グロブリンクラスの特異性分析を例にとって説明する。粒径 $0.5 \mu m$ のラテックス

1には抗ヒトIgG抗体4を、粒径 $1.0\mu\text{m}$ のラテックス2には抗ヒトIgA抗体5を、粒径 $1.5\mu\text{m}$ のラテックス3には抗ヒトIgM抗体6をそれぞれ固相化する。なお、これらの固相抗体には、ラテックス同志の非特異吸着をなくす意味と、抗原との特異性を増強する意味で、モノクローナル抗体の使用が望ましい。反応は、反応用緩衝液 $200\mu\text{l}$ にこれらの抗体結合ラテックス溶液 $50\mu\text{l}$ と、ヒトIgG7、IgA8、IgM9等の抗原が含まれたサンプル $10\mu\text{l}$ と、それぞれFITCで標識した抗ヒトIgG抗体10、抗ヒトIgA抗体11、抗ヒトIgM抗体12の混合溶液 $50\mu\text{l}$ とを添加して行わせる。ここで、標識抗体10、11、12は非特異吸着を少なく、また反応速度を高める目的でFabフラグメントを用いることが望ましい。また、これらの試薬類は全て同時に添加して反応液を得るようにもても良いし、また、共通のサンプルに対して各種の固相抗体および標識抗体を逐次添加した反応液を得るようにもても良い。

【0010】ここで、例えば 37°C 、10分間反応させると、各固相抗体ラテックス-抗原-標識抗体の免疫複合体(Bound)13、14、15と残余の標識抗体(Fre)e16とが生成される。本例では、これを図2に示すフローサイトメータに流して測定する。フローサイトメータは既に知られているように、細胞の分析専用機であり、フローセル21中のニードル22に反応液23を流し、レーザ光24をその流れに照射して細胞から発する散乱光や蛍光を測定する。通常、前方散乱光はレーザ入射光とほぼ水平に位置するディテクタ25で検知され、主に細胞サイズの測定に用いられる。蛍光は、レーザ光24の入射角に対して垂直方向に位置するディテクタ26で検知され、細胞表面の蛍光物質等の測定に用いられる。レーザ光24は単一波長であるため、使用できる蛍光色素に制限があるが、本例の分析方法において用いる蛍光色素FITCは波長 489nm 近くの光を吸収して波長 515nm の蛍光を発するので、この場合は波長 488nm のArレーザを用いれば良い。

【0011】このようにして、反応後の図1に示す免疫複合体13、14、15と残余の標識抗体16とが混ざり合った反応液23をニードル22からフローセル21中に導入し、ニードル22中を流れる各免疫複合体と残余の標識抗体等の各成分のレーザ光24による散乱光および蛍光をディテクタ25および26でそれぞれ検知すれば、ディテクタ25によって各免疫複合体の大きさが測定され、しかもその大きさは各ラテックスの径が $1\mu\text{m}$ 前後であれば、せいぜい数nmの固体抗体-抗原-標識抗体結合部は誤差範囲となるから、殆どラテックスの粒径に依存する。また、同時にディテクタ26により、各ラテックス上に乗った蛍光量/1ラテックスが測定され、これら2つのパラメータによって図3に示すサイトグラムが得られる。なお、図3において縦軸は蛍光量を、横軸は粒子径を表す。

【0012】ここで、抗原抗体反応に関与しなかった残余の標識抗体は微径であるから、1標識抗体あたりの蛍光量の位置31に集中する。また、径が1番小さいラテックスにより結合した図1の免疫複合体13は位置32に、2番目に小さいラテックスにより結合した図1の免疫複合体14は、抗原濃度が高かったのでラテックス1個あたりの蛍光量としてもかなり高い位置33に示される。また、一番ラテックス径が大きかった図1の免疫複合体15は、抗原濃度が薄かったので位置34に示されることになる。

【0013】このようにして蛍光量測定値が得られれば、予めIgG、IgA、IgM等各抗原の既知濃度系列から同様にして求めた蛍光強度と抗原濃度との関係を表す検量線に基づいてサンプル中の各抗原濃度を求めることができる。以上のように、フローサイトメータと、各抗原に応じて異なる抗体を固相化したラテックスを用いるラテックスイムノアッセイとを組み合わせたことにより、1台の測定装置で多項目の分析を高速かつ高精度に実施できる。また、少量のサンプルと反応させた大量のラテックスに関する免疫複合体の大きさを、B-F分離なしにレーザ光によりもれなく測定するので、正確なデータを効率良く得られる。また、抗原の種類毎に粒径が異なるラテックスを同時に用いるようにすれば抗原別の識別が容易な表示も可能となる。

【0014】なお、本発明は上述した実施形態にのみ限定されるものではなく、幾多の変更または変形が可能である。例えば、担体はラテックスに限らず、分子量の均一な人工細胞等、測定対象に応じて任意の形状や大きさのものを用いることができる。また、フローサイトメータにソーティング機能を付加して、測定後に免疫複合体、残余の標識抗体をそれぞれ分離することもできる。このようにすれば、残余の標識抗体を分離して取り出すことができるから、これを再使用することができる。更に、フローサイトメータに反応装置やオートサンプラー等を付加することによって自動測定が容易に行うことができる。この場合、フローサイトメータにおける測定速度は約500粒子/secであるから、1つのサンプルについて 1×10^6 粒子を測定したとしても、3分前後で高速に分析することができる。また、本発明は競合法による分析にも有効に適用することができる。

【0015】
【発明の効果】本発明によれば、フローセル内を流れる反応液中の免疫複合体をレーザ光によりもれなく測定してその個別データを粒子径毎に総量でもって表示するので、免疫学的反応結果を短時間でかつ高精度に分析できる。しかも、反応液を流通させるだけの構成であるから、多項目の分析を1台の自動化装置で分析できる。また、 $10\mu\text{l}$ 程度の少量のサンプルを充分数の担体と緩衝液と混合した反応液を、未反応成分を除去することなく、フローセルのニードルに導入するので、充分数の担

体による測定結果を効率良く得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明における一実施形態の反応模式図である。

【図2】図2はフローサイトメータを説明するための図である。

【図3】図3は測定データのサイトグラムを示す図である。

【符号の説明】

1, 2, 3 ラテックス

* 4, 5, 6 固相抗体

7, 8, 9 抗原

10, 11, 12 標識抗体

13, 14, 15 免疫複合体

16 残余の標識抗体

21 フローセル

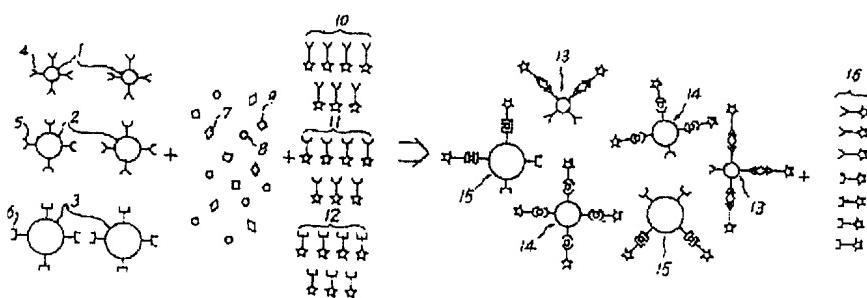
22 ニードル

23 反応液

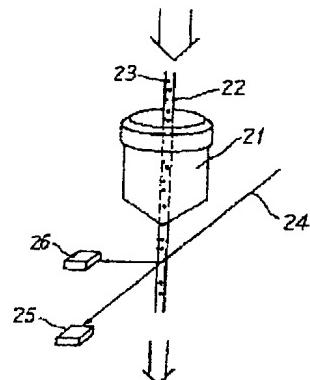
24 レーザ光

* 10 25, 26 ディテクタ

【図1】



【図2】



【図3】

